



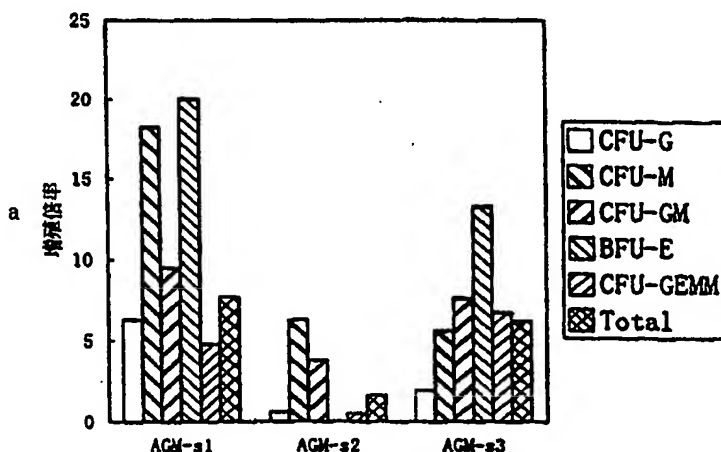
| | | |
|---|---|--|
| <p>(51) 国際特許分類6 C12N 5/16, 5/06, 15/12, A61K 48/00, 35/48, A61L 27/00</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO99/03980</p> <p>(43) 国際公開日 1999年1月28日(28.01.99)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03209</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月16日(16.07.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/191216 1997年7月16日(16.07.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKIKAISHA)[JP/JP] 〒104-0033 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 中畑龍俊(NAKAHATA, Tatsutoshi)[JP/JP] 〒164-0011 東京都中野区中央1-50-3-403 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP)</p> | <p>(81) 指定国 AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, SL, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> | |

(54)Title: AGM-DERIVED STROMA CELLS

(54)発明の名称 AGM領域由来ストローマ細胞

(57) Abstract

A cell line isolated and established from a mammalian fetal AGM region and capable of supporting the proliferation or survival of hematopoietic stem cells and hematopoietic progenitor cells; grafts containing hematopoietic stem cells or hematopoietic progenitor cells cultured together with the above cell line and thus proliferated; gene therapy compositions containing hematopoietic stem cells or hematopoietic progenitor cells cultured together with the above cell line and thus proliferated and carrying a foreign gene transferred thereinto; a method for supporting the proliferation or survival of hematopoietic stem cells or hematopoietic progenitor cells characterized by culturing cells involving at least hematopoietic stem cells or hematopoietic progenitor cells cultured together with the above cell line; a method for transplanting hematopoietic stem cells characterized by transplanting hematopoietic stem cells or hematopoietic progenitor cells cultured together with the above cell line and thus proliferated; and a gene therapy method characterized by transferring a foreign gene into hematopoietic stem cells or hematopoietic progenitor cells cultured together with the above cell line and thus proliferated and then transplanting the cells thus carrying the gene transferred thereinto.



a ... Proliferation ratio

(57)要約

哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株、該細胞株とともに培養されて増殖した造血幹細胞または造血前駆細胞を含む移植片、該細胞株とともに培養されて増殖し、かつ、外来遺伝子が導入された造血幹細胞または造血前駆細胞を含む遺伝子治療用組成物、該細胞株とともに、少なくとも造血幹細胞もしくは造血前駆細胞を含む細胞群またはその分画物を培養することを特徴とする、造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖または生存を支持する方法、及び、該細胞株とともに培養されて増殖した造血幹細胞または造血前駆細胞を移植することを特徴とする造血幹細胞の移植方法、該細胞株とともに培養されて増殖した造血幹細胞または造血前駆細胞に外来遺伝子を導入し、該遺伝子導入細胞を移植することを特徴とする遺伝子治療法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-----------|----|-------------------|----|------------|
| AL | アルバニア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SI | スロヴェニア |
| AM | アルメニア | FR | フランス | LR | リベリア | SK | スロヴァキア |
| AT | オーストリア | GA | ガボン | LS | レソト | SL | シエラ・レオネ |
| AU | オーストラリア | GB | 英国 | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AZ | アゼルバイジャン | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SZ | スワジランド |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | TD | チャード |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BF | ブルキナ・ファソ | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BG | ブルガリア | GW | ギニア・ビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TR | トルコ |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| BR | ブラジル | HR | クロアチア | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| BY | ベラルーシ | HU | ハンガリー | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| CA | カナダ | ID | インドネシア | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CF | 中央アフリカ | IE | アイルランド | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CG | コンゴ | IL | イスラエル | NE | ニジェール | VN | ヴェトナム |
| CH | スイス | IN | インド | NL | オランダ | YU | ユーゴスラヴィア |
| CI | コートジボアール | IS | アイスランド | NO | ノルウェー | ZW | ジンバブエ |
| CM | カメルーン | IT | イタリア | NZ | ニュージーランド | | |
| CN | 中国 | JP | 日本 | PL | ポーランド | | |
| CU | キューバ | KE | ケニア | PT | ポルトガル | | |
| CY | キプロス | KG | キルギスタン | RO | ルーマニア | | |
| CZ | チェコ | KP | 北朝鮮 | RU | ロシア | | |
| DE | ドイツ | KR | 韓国 | SD | スーダン | | |
| DK | デンマーク | KZ | カザフスタン | SE | スウェーデン | | |
| EE | エストニア | LC | セントルシア | SG | シンガポール | | |
| ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | | | | |

- 1 -

明細書

AGM領域由来ストローマ細胞

技術分野

本発明は、AGM領域から分離、株化された細胞株、この細胞株を用いて造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持する方法、この方法によって増殖した造血幹細胞または造血前駆細胞を用いた移植片ならびに遺伝子治療用組成物、及び移植方法ならびに遺伝子治療法に関する。

背景技術

生体内を流れる成熟血液細胞は、短期間の寿命（ヒトでは赤血球で約120日、血小板で約7日）しかなく、成熟血液細胞は造血前駆細胞から毎日分化することによって、末梢血の成熟血液細胞の恒常性を保っている。末梢血に供給される成熟血液細胞の数は、ヒトの場合赤血球で2000億個/日、好中球で700億個/日にもなる。これらの各分化系列の前駆細胞は、さらに未分化な造血幹細胞から分化しながら増殖することで恒常的に末梢血液細胞が枯渇しないようなシステムができている。

このような血液細胞の分化系については、マウスを用いた実験系においてその性質が明らかにされてきた。

末梢血を流れる成熟血液細胞が、一個の造血幹細胞に由来することが明らかにされたのは、TillとMcCullochの研究による(Till, J. E., Rad. Res. 14:213-222, 1961)。放射線を照射して骨髓の造血系を破壊したマウスに他のマウス由来の骨髓細胞を移植したところ、脾臓に血液細胞からなるコロニーの形成(CFU-S; spleen colony-forming-unit)が確認された。このコロニーの数は移植する骨髓細胞の数に比例すること、さらに一個の細胞に由来するコロニーの中に多くの血球系の細胞の存在が確認されることから、多くの血液細胞種に分化できる多分化能を持つ造血幹細胞（多能性幹細胞）が骨髓中に存在することが明らかにされたのである。

その後、造血細胞の性質を解析する手段として放射線照射マウスを用いた移植実験系、さらには、*in vitro* (インビトロ) のコロニー形成法 (Bradley, T. R., J. Exp. Med., 44: 287-299, 1966) が開発され、造血幹細胞および、造血前駆細胞の分化に関する知見が蓄積されてきた。

放射線照射マウスを用いた移植実験系は、最も直接的に造血幹細胞の性質を解析する手法である。放射線照射し造血系に障害を与えたマウス (レシピエント) に、他のマウス (ドナー) から分離した骨髓細胞を移植すると、レシピエントマウス中にドナー由来の造血系を再構築することができる。造血細胞に発現される各種分化抗原 (Spangrude, G. J., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87: 7433-7437, 1990; Visser, J. M. W., 「Flowcytometry in hematology」, Academic Press, p9-29, 1992) を利用して、あるいは、造血細胞の大きさ (Jones, R. J., Nature, 347: 188-189, 1990) を利用して、あるいは、細胞の性質、状態によって染色性の異なる蛍光物質等 (Rh123, Hoechst 33342) (Wolf, N. S., Exp. Hematol., 21: 614-622, 1993) を用いて、骨髓細胞を分画し、上記の移植実験を行うことで、骨髓細胞中の造血幹細胞を同定する試みがなされてきた。これまでの知見から、造血幹細胞は一個の細胞を移植しただけでも、リンパ球系の細胞にも骨髓球系の細胞にも分化することができ、かつ、長期にわたり移植先個体の中で造血系を構築することができることも明らかにされている (Osawa, M., Science, 273: 242-245, 1996)。一個の細胞が長期にわたり移植先の個体で造血系を再構築できるということから、造血幹細胞が移植先個体の中で増殖しているものと考えられている。

放射線照射マウスの移植実験系では、前述のCFU-Sとして検出される造血幹細胞よりもさらに未分化な造血幹細胞を検出することに成功している (Osawa M., Science, 273: 242-245, 1996)。移植実験系で確認される長期の再構築能を有する造血幹細胞と、CFU-Sを形成する造血幹細胞の間で分化段階のヒエラルキーが存在し、この2つの分化段階が可逆的に相互に分化状態が変化できる状況にあるのか、あるいは、造血幹細胞のCFU-Sを形成するレベルへの分化は不可逆的であり、もはや長期骨髓再構築能を持つことはできないのかは、現在のところ不明である。また、このようにマウスの実験系で確実に区別できる造血幹細胞のなかでの差異は、ヒトの臨床においてどの程度意味があるのか判らない。つまり、ヒトの造血幹細胞

の中にもこのような質的な差が認められたとしても、臨床の場ではマウスのCFU-Sに相当するヒト造血幹細胞を利用できるだけで十分なことも考えられる。

一方、近年、種々のサイトカインが取得され、*in vitro*で形成されるコロニー形態から、血液細胞の性質を解析できるようになった (Ogawa, M., Blood, 81:2844-2853, 1993)。造血前駆細胞は多くのサイトカインが存在しても、単一の分化系列の成熟血液細胞にしか分化することはできないが、移植マウスで長期の造血系を構築できる造血幹細胞は、多くの細胞分化系列に分化することが可能である。

これらの結果から、造血幹細胞から末梢血を流れる成熟血液細胞までの分化は、以下のように解釈されている。造血幹細胞は、各種分化系列に分化可能な多分化能を有しており、かつ、この多分化能の性質 (分化多能性) を保持したまま自己複製することが可能である。造血幹細胞は、自己複製するとともに一部は分化し、各種サイトカインの作用を受け、次第に分化できる細胞系列が狭まり、限られた細胞種へしか分化できない造血前駆細胞へと分化増殖し、最終的に成熟血液細胞になる。

以上のように、造血幹細胞に関する一連の研究は、マウスによってなされてきたが、これは前述の通り移植の実験系によって長期にわたり造血細胞が出現することを確認できることによる。ヒトでも同様の造血細胞の分化様式が存在すると考えられているが、ヒトではヒト同士の移植の実験系を樹立することは不可能であり、マウスと同レベルの造血幹細胞の同定は難しい。

ヒトで実現できない移植実験系を、免疫寛容な実験動物を用いて実現しようという試みもある。免疫系が構築されていないヒツジ胎児 (Civin, C. I., Blood, 88:4102-4109, 1996)、あるいは、免疫不全マウス (Human Hematopoiesis in SCID mice, Springer-Verlag, 1995) に、ヒト造血細胞を移植し、移植動物の体内でのヒト血液細胞の生着状況を観察することで造血幹細胞を同定する試みもなされているが、これらの実験を行うのは容易ではないし、これらの実験結果の解釈も種を越えた移植であることから多くの因子を考慮に入れなければならない、慎重に行わなければならない。

ヒト造血幹細胞を評価するため、*in vitro*の評価系が種々作られている (Moore, M. A. S., Blood, 78:1-19, 1991)。そのなかで広く用いられているのは、*in vit*

roのコロニー形成能について調べることである。造血幹細胞を種々の血液細胞が出現できるように種々のサイトカインを添加した培地にて培養すると、分化方向の決定された造血前駆細胞は、小数あるいは、単一の分化系列の細胞しか含まないコロニーを形成するが、多分化能を持つ造血幹細胞は、複数の分化系列の血液細胞を含むコロニーを形成することができる。特に、赤血球を含む混合コロニー (CFU-E mix) を形成することが、ヒトでは造血幹細胞の指標とされている。これらの評価系を用いて明らかにされてきたヒト造血幹細胞は、CD34抗原及びc-KIT (c-kit遺伝子産物) を発現している。また、これらの造血幹細胞は、骨髄、胎児肝臓、胎児骨髄、臍帯血、抗癌剤あるいはサイトカインの投与を受けた末梢血液中に存在が確認されている。

試験管内で造血細胞を長期間維持することが可能になったのは、Dexterによって骨髄の血液細胞以外の線維芽細胞、前脂肪細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞などのストローマ細胞 (間質細胞とも称する) と、骨髄の血液細胞を試験管内で共培養する系を確立してからである (Dexter, T.M., J. Cell. Physiol., 91:335-344, 1977)。この培養系では、造血細胞が増殖し、培地中に浮遊して行く様子を6ヶ月以上に亘って観察することができる。このことから、骨髄ストローマ細胞が造血幹細胞、造血前駆細胞に好ましい培養環境を提供することで、造血幹細胞、造血前駆細胞が長期にわたり、生存維持されているものと考えられる。このDexter培養系には、非常に多くの細胞種が存在しており、どの細胞種が造血幹細胞の維持に関っているかは明らかでないが、骨髄中に造血幹細胞の維持に関与する細胞群が存在するとも考えられる。したがって、骨髄より造血幹細胞の増殖、維持を支持する細胞を単離してくることも可能かと考えられた。この点を明らかにするため、骨髄細胞から造血系の細胞ではない骨髄間質細胞であるストローマ細胞を種々株化し、その造血幹細胞、造血前駆細胞の増殖支持について解析されている。(Deryugina E.I., Critical Reviews in Immunology, 13:115-150, 1993)。しかし、造血幹細胞の増殖維持を可能にする細胞株は取得されていない。また、国際特許出願(W096/02662, Torok-Storb等)には、造血前駆細胞を維持増殖させるストローマ細胞株について開示されているが、これらの骨髄細胞を不死化した細胞株に造血幹細胞を増殖させる活性は見出せない。

また、米国特許 5 5 9 9 7 0 3 号 (Davis等) には、ブタ脳微細血管系の血管内皮細胞を用いた造血幹細胞増殖系について開示されているが、この培養系には少なくとも一種のサイトカインを添加する必要がある、かつ、サイトカインを添加しないで血管内皮細胞のみを用いた場合の造血幹細胞の増殖については記載がない。このようなサイトカイン添加による培養系では、その細胞自体の能力が正確に評価されているとは考えがたい。

一方、造血組織について発生の段階から検討すると、先ず、卵黄嚢で赤血球を中心とした造血が生じる。しかし、卵黄嚢における造血は一過性のものであり、この領域に存在する造血細胞は他の器官に移行することなくこの場で消滅して行くものと考えられている。その後の主要な造血器官は、肝臓、骨髄へと移行して行き、肝臓以降の造血細胞が、成体で血液細胞の恒常性を維持するために増殖分化している造血幹細胞になるものと考えられる (Zon, L. I., Blood, 86: 2876-2891, 1995)。肝臓での造血を担う造血幹細胞は、肝臓での造血に先立ち A G M (Aorta-Gonad-Mesonephros) 領域で発生するものと考えられる (Tavian, M. Blood, 87:66-72 1996; Sanchez, M-J., Immunity, 5:513-525, 1996)。ここで A G M 領域とは、哺乳類胚の発生初期の大動脈 (Aorta)、生殖腺原基 (Gonad)、中腎原基 (Mesonephros) の存在する領域をいう。ヒトでは胎生 20 日から 50 日前後、マウスでは胎生 9 日から 12 日前後に見られる場合が多い。つまり成人型の造血幹細胞は A G M で発生した後、肝臓、骨髄へと移行し自己複製するとともに分化し、全身を循環する末梢血液細胞を供給するものと考えられている。

上記の A G M で成体型の造血幹細胞が出現することを支持する知見が、近年得られてきている (Sanchez, M-J., Immunity, 5:513-525, 1996)。注目すべきは A G M の器官培養を行うと、この領域で造血幹細胞が増殖していると推測されることであり (Medvinsky, A., Cell, 86: 897-906, 1996; Sanchez, M-J., Immunity, 5:513-525, 1996)、この領域が造血幹細胞の発生部位であるとともに、この領域で造血幹細胞がその数を増すと想定される。すなわち、この領域に存在する細胞が造血幹細胞の分化を調節し、かつ、その増殖を支持していると考えられる。しかしながら、これらの結果は、器官培養系あるいは組織を直接分離してきた標品について評価しているだけで、これらの種々の細胞種が存在した組織の中から、

造血幹細胞、造血前駆細胞の増殖を制御する細胞は特定されていなかった。

ところで、多能性幹細胞の障害で起こる疾患である再生不良性貧血や先天性免疫不全症では、治療の一つとして骨髄移植が行われている。患者に骨髄を移植することによって、血球系細胞の生産能を高めることができる。また、白血病に対する全身X線療法や大量化学療法は有効な治療法であるが、これらの治療によって骨髄細胞が破壊されてしまうので、これらの治療と組み合わせて骨髄移植が行われている。しかしながら、骨髄移植には、ドナーと患者の組織適合抗原が合致する確率が極めて低いことや、強力な免疫抑制が必要となること等の問題がある。また、移植に用いる骨髄の採取は、全身麻酔下で腸骨嚢で骨髄穿刺することによって行われるため、ドナーにとっても苦痛や危険が伴う。

これに対し、臍帯血は、骨髄細胞に比べて移植後の移植片対宿主病（GVHD）の頻度が低く、免疫抑制の必要性も低いため、幹細胞の供給源として注目されている。しかしながら、臍帯血から得られる造血幹細胞が、量的に成人の移植が可能なかぎりあるかどうかは現在確かめられていない。臍帯血中に存在する幹細胞を増殖させることができれば、一人の臍帯血を複数のレシピエントに有効に利用することができ、臍帯血の提供者自身が将来白血病化しても自己の臍帯血を使えるようになる。

また、近年、先天性の遺伝子疾患患者に対し、欠失あるいは、変異遺伝子を相補する遺伝子治療の試みがなされている（大橋十也、実験医学、12：333、1994）。遺伝子治療では、卵子や精子のような生殖細胞に遺伝子を導入することは禁止されており、遺伝子を担う細胞として患者体内に永続的に存在する造血幹細胞を用いることが、疾患の根本的な治療になると考えられている。これらの遺伝子治療は、まだ試験的なレベルにあり、治療法として確立するためには幾つかの障害が残されている（Mulligan, R.C., Science, 260:926, 1993）。最も重要な課題は、造血幹細胞に効率良く遺伝子を導入することである。この点を改善するためには、幹細胞を分化させずに細胞周期を回転させること、さらに、遺伝子導入に用いるウィルスベクターを高効率で産生させること、高効率で感染できるベクター系を開発することに集約することができる。

発明の開示

本発明は、上記観点からなされたものであり、骨髓移植や臍帯血移植に代わる血液細胞移植に用いることのできる造血幹細胞又は造血前駆細胞、あるいは遺伝子治療に用いることのできる造血幹細胞又は造血前駆細胞を得る手段を提供することを主な目的とするものであり、具体的には、造血幹細胞及び造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得るストローマ細胞株、このストローマ細胞株を用いて造血幹細胞及び造血前駆細胞の増殖または生存を支持する方法、及びこれらのストローマ細胞株及び方法を応用した新規な技術を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、造血幹細胞及び造血前駆細胞を効率良く増殖させる支持細胞の源としてAGM領域が好適であり、このAGM領域から分離し、株化したストローマ細胞株が、造血幹細胞及び造血前駆細胞を増殖させることができることを見出した。また、得られたストローマ細胞株の用途について検討を行った結果、本発明のストローマ細胞株とともに培養された造血幹細胞または造血前駆細胞は、血液細胞移植や遺伝子治療の材料として好適に用いることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株である。

また本発明は、少なくとも一部が多分化能を維持したまま造血幹細胞または造血前駆細胞を増殖させ得る前記細胞株、および、少なくとも一部が細胞周期の回転を伴うように造血幹細胞を生存させ得る前記細胞株を提供する。

本発明はまた、発癌遺伝子またはアポプトーシス関連遺伝子が導入され、該遺伝子によって自己の増殖または生存が調節される前記細胞株、および、細胞刺激因子をコードする遺伝子が導入された前記細胞株を提供する。

さらに本発明は、前記細胞株とともに培養されて増殖した又は生存が維持された造血幹細胞または造血前駆細胞を含む移植片、および、前記細胞株とともに培養されて増殖し又は生存が維持され、かつ、外来遺伝子が導入された造血幹細胞または造血前駆細胞を含む遺伝子治療用組成物を提供する。

本発明はまた、哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹

細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株とともに、少なくとも造血幹細胞もしくは造血前駆細胞を含む細胞群またはその分画物を培養することを特徴とする、造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖または生存を支持する方法を提供する。前記細胞群としては、臍帯血、胎児肝臓、骨髓、胎児骨髓、または末梢血由来の細胞群が挙げられる。

また本発明は、哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株とともに培養されて増殖した又は生存が維持された造血幹細胞または造血前駆細胞を移植することを特徴とする造血幹細胞または造血前駆細胞の移植方法を提供する。

さらに本発明は、哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株とともに培養されて増殖した又は生存が維持された造血幹細胞または造血前駆細胞に外来遺伝子を導入し、該遺伝子導入細胞を移植することを特徴とする遺伝子治療法を提供する。

本明細書において用いる用語につき、以下の通り定義する。

AGM (Aorta-Gonad-Mesonephros)領域とは、胎児の大動脈、生殖腺原器、中腎原器のことを指す。AGM領域は、胎児期での成人型の造血幹細胞が出現する解剖学的に特定された領域である。

ストローマ細胞とは、造血細胞群の生存、分化、増殖を支持する造血細胞以外の造血組織に存在する細胞群ならびにこれを構成する細胞をさす。これらの細胞には、線維芽細胞、前脂肪細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、などの細胞種が認められる。

造血幹細胞とは、血球の全ての分化系列に分化し得る多分化能を有する細胞であり、かつ、その多分化能を維持したまま自己複製することができる細胞である。現在のヒトの幹細胞の評価系では、in vitroのアッセイ系で赤血球を含むコロニー (CFU-Emix) を形成し得る細胞として識別される。

造血前駆細胞とは、単一の血液細胞分化系列あるいは、全てではない複数の分化系列に分化できる細胞を称し、これらの細胞は単一あるいは複数の分化系列の細胞への分化が可能である。

AGM領域由来ストローマ細胞株とは、AGM領域から分離・株化された単一なストローマ細胞をいう。

尚、本明細書において、AGM領域由来ストローマ細胞株を、単に「ストローマ細胞株」または「本発明の細胞株」ということがある。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のストローマ細胞株は、哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株である。

本発明の細胞株を分離、株化する方法を、以下に例示する。

マウスの雌雄をSPF (specific pathogen-free) の環境のもとで飼育し、雌を雄と一晩、同じケージにいれ、翌朝、膣栓の存在が確認された雌マウスを新しいケージに移して飼育する。膣栓の確認された日を、懐胎0.5日とし、懐胎8～13日、好ましくは10.5日目のマウスから胎児を摘出する。胎児からAGM領域を分離する方法は、Godin等 (Godin, I., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92:773-777, 1997)、Medvinsky等 (Medvinsky, A. L., Blood, 87:557-565, 1996) に記載されている。すなわち、胎児が浸る程度にリン酸緩衝生理食塩水を入れた培養皿に胎児を入れ、実体顕微鏡下で、AGM領域を他の領域を含まないように切除し、新たな培養皿に移す。

上記のようにして得られたAGM領域に、培地、例えば10% FCS (ウシ胎児血清) を含むMEM培地を一滴加え、37℃、5% CO₂、湿度100%の条件下で一晩培養する。AGM領域の細胞が、培養皿に付着したところで、さらに、培地を添加して培養を継続し、AGM領域組織片の周辺にストローマ細胞を出現させる。さらに1週間程度培養を継続した後、接着細胞をトリプシン処理によって剥がし、培地で洗浄し、培養皿に播種する。翌日、培養皿に付着しなかった細胞を培地とともに除去し、新たに新鮮な培地を添加する。トリプシン処理後の培養開始から2週間後に、内在する造血細胞を除去するため900rad程度のγ線を照射する。その2週間後、培養系をトリプシン処理して細胞を懸濁し、10～20,000細胞/ウェル、好ましくは50～100細胞/ウェルとなるように24ウェル培養皿に

播種する。その際、播種する細胞数を少くし、直接限界希釈法によるクローニングを行おうとすると、細胞は増殖しないので、一つのウェルに播種する細胞数を多くし、少ない細胞数からの増殖に耐えられるように細胞を馴化した後、限界希釈法によるクローニングを行うことが好ましい。続いて、3週間程度培養を継続した後、限界希釈法により、0.05～1細胞/ウェル、好ましくは0.3細胞/ウェルとなるように96ウェル培養皿に細胞を播種し、一個の細胞のみが播種されているウェルから増殖してくる細胞を拡大培養する。

上記のようにして得られた細胞の中から、造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖、生存を支持することのできる細胞を選択することによって、本発明のストローマ細胞株が得られる。このような細胞の選択は、候補株と造血幹細胞または造血前駆細胞とを共培養した後、造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖の程度を評価することによって行うことができる。造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖の程度は、共培養開始時と共培養後の細胞をそれぞれサイトカイン存在下で培養し、血液細胞のコロニー数を比較することによって行われる。

尚、上記においては、マウスのAGM領域からストローマ細胞株を樹立する方法を具体的に説明したが、ストローマ細胞株の樹立に用いるAGM領域はマウス由来に限られるものではなく、他の哺乳動物、例えば、ブタ、ヒツジ、ヒト等のAGM領域でもよい。AGM領域での造血幹細胞の出現は、ヒト (Tavian, M., Blood, 87:67-72, 1996)、マウス (Sanchez, M-J., Immunity, 5:513-525, 1996) とともに確認されており、哺乳類の発生過程で共通の機構が存在すると考えられる。後述の実施例1に示すように、マウスのAGM領域由来のストローマ細胞株を用いてヒト臍帯血由来の造血幹細胞を増殖させることができることから、マウス以外の、ヒトその他の哺乳動物のAGM領域から、実施例で得られたストローマ細胞株と同等のストローマ細胞を分離し、同等な利用が可能であることが強く支持される。

上記のようにして、AGM領域から単一のストローマ細胞を分離し、株化することができる。このストローマ細胞株は、造血幹細胞及び造血前駆細胞の増殖、生存を支持することができる。すなわち、ストローマ細胞株と、造血幹細胞もしくは造血前駆細胞またはこれらの少なくともいずれかを含む造血細胞群とを共培

養すると、造血幹細胞は細胞周期を回転し、一部は幹細胞のまま自己複製し、一部は造血前駆細胞へと分化しながら増殖し、造血幹細胞はこの培養系で維持される。また、上記共培養によって、造血前駆細胞は、単一あるいは複数の分化系列の細胞に分化しながら増殖する。

本発明のストローマ細胞株に、発癌遺伝子またはアポトーシス関連遺伝子を導入し、得られる遺伝子導入株を用いて造血幹細胞および造血前駆細胞とともに培養すると、ストローマ細胞株の増殖または生存を調節することが可能となる。ストローマ細胞株の生育を調節できれば、ストローマ細胞株を効率良く増やすことができ、かつ、その寿命を延長させることも可能と考えられる。一般に発癌遺伝子は、増殖に関して有利に作用すると考えられ、これらの遺伝子を導入することでAGM由来ストローマ細胞の増殖速度を調節したり、寿命を延長することができ (Roecklein, B. A., Blood, 85:997-1005, 1995; Whitehead, R. H., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:587-591, 1993)。

逆に、ストローマ細胞株を用いた共培養系で増幅した造血細胞を体内に移植する場合等には、ストローマ細胞株は体内で悪影響を及ぼす可能性があり、体内に持ち込むことは避けることが好ましい。ストローマ細胞株の生存を調節できれば、造血細胞の培養後にストローマ細胞株のみを死に至らしめ、除去することも可能と考えられる。そこで、細胞死を誘導するような遺伝子を、外部からの刺激で発現の調節ができるような形にしておき、ストローマ細胞株に導入しその増殖、生存を人為的に調節可能とするような系を作ることでもある。

発癌遺伝子としては、ヒトパピローマウイルス遺伝子 (Halbert, C. L., J. Virol., 65:473, 1991; Ryan, M. J., Kidney Int 45:48, 1994)、SV40遺伝子 (Chou, J. Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1854-1858, 1978; Chou, J. Y., J. Cell Biol., 89:216-222, 1981) が、アポトーシス関連遺伝子としては、デス領域を持つ受容体遺伝子、例えば、Fas (Itoh, N., Cell, 66:233-243, 1991), TNF receptor type II (Loetscher, H., Cell 61 (2): 351-359, 1990), Death receptor 3 (Kitoson, J., Nature, 384:372-375, 1996), Death receptor 4 (Pan, G., Science, 276:111-113, 1997), や、上記受容体の信号伝達系に属するタンパク質分解酵素であるICE (IL-1 β converting enzyme) (Cerretti, D. P., Sc

ience 256:97-100, 1992), さらには、Caspase Family(Patel, T, FASEB. J., 10:587-597, 1996)、例えばCPP32(Fernandes-Alnemri, T, J. Biol. Chem., 269:30761-30764, 1994)などが挙げられる。また、これらの遺伝子の発現を人為的に制御するには、テトラサイクリンを用いた発現誘導系 (Manfred, G., Proc. Natl. Acad., Sci. USA, 89:5547-5551, 1992)が利用できる。これらの遺伝子をストローマ細胞株に導入するには、宿主にストローマ細胞株を用いる以外は、通常動物細胞への遺伝子導入に用いられる方法、例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス等のレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (Kotin, R.M. Hum Gene Ther 5: 793, 1994)、単純ヘルペスウイルスベクター等のウイルス由来の動物細胞用ベクターを用いる方法、リン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等を用いることができる。アポトーシス関連遺伝子を導入する際に、該遺伝子に加えて薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を用いると、目的遺伝子が導入されたストローマ細胞株の選択が容易となる。

本発明の造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖または生存を支持する方法は、上記ストローマ細胞株の持つ性質を利用したものであり、ストローマ細胞株とともに、少なくとも造血幹細胞もしくは造血前駆細胞を含む細胞群またはその分画物を培養することからなる。ここで細胞群とは、造血幹細胞または造血前駆細胞のいずれか一方が単離されたものであってもよく、これらの両方であってもよい。また、造血幹細胞または造血前駆細胞の少なくとも一方を含み、さらに他の造血細胞を含んでいてもよい。また、分画物とは造血幹細胞または造血前駆細胞を含む細胞群から分画された造血幹細胞または造血前駆細胞を含む分画をいう。以下、このような細胞群またはその分画物を、単に造血幹細胞および造血前駆細胞ということがある。

本発明の方法における造血幹細胞および造血前駆細胞の採取源としては、ヒト及びマウス等の哺乳動物の胎児肝臓、骨髄、胎児骨髄、末梢血、サイトカインおよび/または抗癌剤の投与によって幹細胞を動員した末梢血、及び臍帯血等が挙げられ、造血幹細胞を含む組織であればいずれであってもよい。

ストローマ細胞株と造血幹細胞または造血前駆細胞を培養するにあたっては、いわゆる培養用のシャーレ、フラスコを用いた培養法が可能であるが、培地組成、pHなどを機械的に制御し、高密度での培養が可能なバイオリアクターによって、その培養系を改善することもできる (Schwartz, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88: 6760, 1991; Koller, M. R., Bio/Technology, 11:358, 1993; Koller, M. R., Blood, 82: 378, 1993; Palsson, B. O., Bio/Technology, 11:368, 1993)。

培養に用いる培地としては、造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖、生存が害されない限り特に制限されないが、例えばSF-02培地 (三光純薬)、Opti-MEM培地 (GIBCO BRL)、MEM培地 (GIBCO BRL)、IMDM培地 (GIBCO BRL)、PRMI1640培地 (GIBCO BRL)、が好ましいものとして挙げられる。培養温度は、通常25～39℃、好ましくは33～39℃である。また、培地に添加する物質としては、ウシ胎児血清、ヒト血清、ウマ血清、インシュリン、トランスフェリン、ラクトフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、モノチオグリセロール、2-メルカプトエタノール、ウシ血清アルブミン、ビルビン酸ナトリウム、ポリエチレングリコール、各種ビタミン、各種アミノ酸、各種増殖因子、好ましくはEGF (上皮増殖因子)、PDGF (血小板由来増殖因子)、bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子)、O₂は、通常、4～6%であり、5%が好ましい。

上述したように、本発明のストローマ細胞株は、造血幹細胞及び造血前駆細胞の増殖、生存の支持に利用できるが、細胞刺激因子を共培養系に添加することによって、より有効に増殖、生存を支持することができる。このような細胞刺激因子は、ストローマ細胞株が造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖、生存を支持するのを妨げないものであれば、特に制限されないが、具体的には、SCF (幹細胞成長因子 (stem cell factor))、IL-3 (インターロイキン-3)、GM-CSF (顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子 (granulocyte/macrophage colony-stimulating factor))、IL-6 (インターロイキン-6)、TPO (トロンボポエチン)、G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor))、TGF- β (トランスフォーミング成長因子- β)、MIP-1 α (Davatelis, G., J. Exp. Med. 167:1939-1944, 1988)等のサイトカインに代表される増殖刺激因子、EPO (エリスロポエチン) のような造血ホルモン、Wnt (Thimoth, A. W., Blood, 89:3624

-3635, 1997) 遺伝子産物のような分化増殖調節因子、あるいはNotch/Delta (Moore K. A., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94: 4011-4016, 1997) 系の遺伝子産物のような発生調節因子等が挙げられる。

また、上記のような細胞刺激因子をコードする遺伝子をストローマ細胞株に、該細胞内で前記遺伝子が発現できるような形で導入し、得られる遺伝子導入株を用いることによっても、前記培養系を改善することができる。

さらに、ストローマ細胞株を培養して得られる培養上清に、造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖、生存の支持に寄与する活性がみられる場合には、その培養上清のみを造血幹細胞または造血前駆細胞の培養に付することも可能である。さらに、ストローマ細胞と造血幹細胞または造血前駆細胞を、細胞は透過させないが、これらの造血細胞の増殖、生存の支持に関与する因子は透過させることができるような多孔質の膜で分離して培養することも可能である。その際、造血細胞の生存増殖に有利になるように、前述したような種々の細胞刺激因子を培養系に添加することも可能である (Verfaillie, C. M., Blood, 84: 1442-1449, 1994)。

上記で述べた細胞刺激因子、細胞刺激因子をコードする遺伝子、発癌遺伝子、アポトーシス関連遺伝子の取得、ならびに細胞への添加、細胞への遺伝子の導入方法、細胞の培養方法は、当業者に周知の方法により行われる。(Robin Callard et al, The Cytokine Facts Book, Academic Press Inc., 1994; 村松正実、遺伝子工学ハンドブック、羊土社、1991; 黒木登志夫、細胞工学ハンドブック、羊土社 1992; 黒木登志夫、培養細胞実験法、羊土社 1995を参照されたい。)

上記のようにして、本発明の細胞株とともに培養されて増殖した造血幹細胞または造血前駆細胞は、従来の骨髄移植や臍帯血移植に代わる血液細胞移植用の移植片として用いることができる。造血幹細胞の移植は、移植片が半永久的に生着させられることから、従来の血液細胞移植治療を改善することができる。従来、骨髄移植には、大量の骨髄の採取が必要であったが、本発明によれば、少量の骨髄採取で済ますことができる。例えば、自己免疫疾患等の骨髄移植によってその改善の見られる疾患に対しては、自己あるいは非自己の幹細胞を増殖させるに際し、本発明による幹細胞増殖技術を利用することができる。

本発明の方法による造血幹細胞の移植は、白血病に対する全身X線療法や高度

化学療法を行う際に、これらの治療と組み合わせる他、種々の疾患に用いることができる。例えば、固形癌患者の化学療法、放射線療法等の骨髄抑制が副作用として生じる治療を実施する際に、施術前に骨髄を採取しておき、造血幹細胞、造血前駆細胞を試験管内で増幅し、施術後に患者に戻すことで、副作用による造血系の障害から早期に回復させることができ、より強力な化学療法を行えるようになり、化学療法の治療効果を改善する事ができる。また、本発明を利用して、患者あるいは他人の造血幹細胞ならびに造血前駆細胞を各種血液細胞に分化させ、それらを患者の体内に移入することにより、各種血液細胞の低形成により不全な状況を呈している患者の改善を図ることができる。また、再生不良性貧血などの貧血を呈する骨髄低形成に起因する造血不全症を改善することができる。その他、本発明の方法による造血幹細胞の移植が有効な疾患としては、慢性肉芽腫症、重複免疫不全症候群、無ガンマグロブリン血症、Wiskott-Aldrich症候群、後天性免疫不全症候群（AIDS）等の免疫不全症候群、サラセミア、酵素欠損による溶血性貧血、鎌状赤血球症等の先天性貧血、Gaucher病、ムコ多糖症等のリソゾーム蓄積症、副腎白質変性症、各種の癌または腫瘍等が挙げられる。

本発明の移植片を用いた造血幹細胞の移植は、用いる細胞以外は、従来行われている骨髄移植や臍帯血移植と同様に行えばよい。

上記のような造血幹細胞移植に用いられる可能性のある造血幹細胞の由来は、骨髄に限られず、前述したような胎児肝臓、胎児骨髄、末梢血、サイトカインおよび／または抗癌剤の投与によって幹細胞を動員した末梢血、及び臍帯血等を用いることができる。本発明の移植片は、本発明の方法によって増殖した造血幹細胞及び造血前駆細胞の他に、緩衝液等を含む組成物としてもよい。

また、本発明の細胞株とともに培養されて増殖した造血幹細胞または造血前駆細胞は、ex vivoの遺伝子治療に用いることができる。遺伝子治療には、DNAを患者に直接投与するin vivo法と、標的細胞にDNAを導入し、遺伝子導入細胞を患者に移植するex vivo法がある。ex vivo法において標的細胞に骨髄細胞を用いる場合には、大量の骨髄の採取が必要であったが、本発明によれば、少量の骨髄採取で済ますことができる。また、造血幹細胞が自己複製し、長期的に造血細胞を供給できる性質は、遺伝子治療の好適な標的と考えられているが、従来、その

細胞周期を回転させることができず、遺伝子の導入が困難であった。本発明のストローマ細胞株と造血幹細胞または造血前駆細胞とを共培養することにより、これらの細胞の細胞周期を回転させることが可能となり、遺伝子導入を容易に行うことができる。

本発明を利用した遺伝子治療は、ストローマ細胞とともに培養されて増殖した造血幹細胞または造血前駆細胞に外来遺伝子（治療用遺伝子）を導入し、得られる遺伝子導入細胞を用いて行われる。本発明の遺伝子治療用組成物を用いた遺伝子治療は、ストローマ細胞と共培養して増幅した造血幹細胞または造血前駆細胞を標的細胞として用いる以外は、従来行われている遺伝子治療と同様に行えばよい。導入される外来遺伝子は、疾患によって適宜選択される。血液細胞を標的細胞とする遺伝子治療の対象となる疾患としては、慢性肉芽腫症、重複免疫不全症候群、無ガンマグロブリン血症、Wiskott-Aldrich症候群、後天性免疫不全症候群（AIDS）等の免疫不全症候群、サラセミア、酵素欠損による溶血性貧血、鎌状赤血球症等の先天性貧血、Gaucher病、ムコ多糖症等のリソゾーム蓄積症、副腎白質変性症、各種の癌または腫瘍等が挙げられる。

標的細胞に用いる造血幹細胞の由来は骨髓に限られず、胎児肝臓、胎児骨髓、末梢血、サイトカインおよび／または抗癌剤の投与によって幹細胞を動員した末梢血、及び臍帯血等を用いることができる。

造血幹細胞または造血前駆細胞に治療用遺伝子を導入するには、通常動物細胞の遺伝子導入に用いられる方法、例えば、モロニーマウス白血病ウイルス等のレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター等のウイルス由来の動物細胞用ベクターを用いる方法、リン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法、リポソーム法、リポフェクション法、マイクロインジェクション法等を用いることができる。これらの中では、標的細胞の染色体DNAに組み込まれて恒久的に遺伝子の発現が期待できるという点から、レトロウイルスベクターまたはアデノ随伴ウイルスベクターが好ましい。

例えば、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは、次のようにして作製することができる。まず、野生型アデノ随伴ウイルスDNAの両端のITR（inverted t

terminal repeat) の間に治療用遺伝子を挿入したベクタープラスミドと、ウイルスタンパク質を補うためのヘルパープラスミドを293細胞にトランスフェクションする。続いてヘルパーウイルスのアデノウイルスを感染させると、AAVベクターを含むウイルス粒子が産生される。あるいは、アデノウイルスの代わりに、ヘルパー機能を担うアデノウイルス遺伝子を発現するプラスミドをトランスフェクションしてもよい。次に、得られるウイルス粒子を造血幹細胞または造血前駆細胞に感染させる。ベクターDNA中において、目的遺伝子の上流には、適当なプロモーター及びエンハンサーを挿入し、これらによって遺伝子の発現を調節することが好ましい。さらに、治療用遺伝子に加えて薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を用いると、治療用遺伝子が導入された細胞の選択が容易となる。治療用遺伝子は、センス遺伝子であってもアンチセンス遺伝子であってもよい。

レトロウイルスベクターを用いる場合は、造血幹細胞は細胞周期ではG0期にあるものが大半であり、レトロウイルスが感染できないため、造血幹細胞にIL-1、IL-3、IL-6及びSCFを作用させて細胞周期に入らせてから、ウイルスを感染させる必要がある (Nolta, J., Exp. Hematol, 20:1065-1071 1992)。本発明の細胞株は、造血幹細胞の細胞周期を回転させることができるため、効率の良いウイルス感染が可能である。また、ウイルス感染に際し、骨髓支持細胞を共存させると感染効率が高まるとの報告もあり (Moore, K. A., A. B. Blood, 79:1393-1399, 1992)、アポトーシス関連遺伝子が導入されたストローマ細胞株と造血幹細胞が共存したままウイルスを感染させた後、アポトーシス関連遺伝子を発現させてストローマ細胞株を死滅させる方法が考えられる。

本発明の遺伝子治療用組成物は、本発明の方法によって増殖した造血幹細胞及び造血前駆細胞の他に、緩衝液、新規の活性物質等を含む組成物としてもよい。

図面の簡単な説明

図1は、マウスAGM由来ストローマ細胞株とCD34陽性ヒト臍帯血由来造血幹細胞との共培養開始から4週間後のコロニーアッセイの結果を示す図である。

図2は、マウスAGM由来ストローマ細胞株とCD34陽性ヒト臍帯血由来造血幹細胞との共培養開始から3週間後のコロニーアッセイの結果を示す図である。

図3は、マウスAGM由来ストローマ細胞株とCD34陽性ヒト臍帯血由来造血幹細胞との共培養開始から6週間後のコロニーアッセイの結果を示す図である。

図4は、マウスAGM由来ストローマ細胞株とマウス骨髄由来c-KIT⁺Sca-1⁺Lin⁻造血幹細胞との共培養開始から10日後のコロニーアッセイの結果を示す図である。

図5は、マウス骨髄由来造血幹細胞を移植したマウス末梢血の骨髓球系細胞及びリンパ球系細胞におけるドナー細胞の割合を示す図。○は、造血幹細胞をAGM-S3と共培養したものを、▲は、造血幹細胞をAGM-S3と共培養を移植していないものを示す。

図6は、マウス胎児由来造血幹細胞を移植したマウス末梢血の骨髓球系細胞及びリンパ球系細胞におけるドナー細胞の割合を示す図。○は、造血幹細胞をAGM-S3と共培養したものを、▲は、造血幹細胞をAGM-S3と共培養を移植していないものを示す。

発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1 造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得るAGM由来ストローマ細胞株の樹立

<1> AGM由来ストローマ細胞株の樹立

(1) マウス胎児のAGM領域の分離

C3H/HeNSLcマウス（日本エスエルシー株式会社より購入）の雌雄をSPF (specific pathogen-free) の環境のもとで飼育した。1ないし2匹の雌を1匹の雄と一晩、同じケージにいれ、翌朝、膣栓の存在が確認された雌マウスを新しいケージに移して飼育した。膣栓の確認された日を、懐胎0.5日とした。懐胎10.5日目のマウスを頸椎脱臼により死に至らしめた後、胎児を摘出した。AGMの分離は、Godin等 (Godin, I., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92:773-777, 1995)、Medvinsky等 (Medvinsky, A. L., Blood, 87:557-565, 1996) の方法に準拠して実施した。胎児が浸る程度にPBS (-) (リン酸緩衝生理食塩水) (日水製薬製) を

入れた培養皿に胎児を入れ、実体顕微鏡下で、AGM領域を他の領域を含まないように慎重に切除し、新たな24ウェルの培養皿 (Nunc #143982) に移した。

(2) AGM由来細胞株の樹立

24ウェルの培養皿 (Nunc #143982) に移したAGM領域に、10% FCS (Hyclone社) を含むMEM培地 (Sigma社) を一滴加え、一晚、培養器中で培養した。実施例中の培養は、ことわりのない限り、10% FCS (Hyclone社) を含むMEM培地 (Sigma社)、37℃、5% CO₂、湿度100%の条件下で行った。一晚の培養で、AGM領域の細胞が、培養皿に付着したところで、さらに、2mlの10% FCSを含むMEM培地を添加した。その後、培養を継続することにより、AGM領域組織片の周辺には次第にストローマ細胞が出現した。さらに1週間培養を継続した後、接着細胞をトリプシン処理 (0.05% トリプシン, 0.53mM EDTA (Gibco BRL社) を含むPBS中、37℃、3～5分) によって剥がした後、培地で2回洗浄し、6ウェル培養皿 (Nunc #152795) に播種した。翌日、培養皿に付着しなかった細胞を培地とともに除去し、新たに新鮮な培地を添加した。6ウェル培養皿に移してから2週間後に、内在する造血細胞を除去するため900 Radの γ 線を照射した。この培養系から限界希釈法で直接細胞のクローニングを行ったが、細胞の増殖は認められず、クローニングすることはできなかった。そこで、一つのウェルに播種する細胞数を増やし、少ない細胞からの増殖に耐えられるように細胞を馴化してから限界希釈法によるクローニングを実施することとした。

すなわち、上記と同様にして、AGMを摘出して培養を行い、 γ 線を照射してから2週間になる培養系をトリプシン処理 (0.05% トリプシン, 0.53mM EDTAを含むPBS中、37℃、3～5分) して細胞を懸濁し、50～100細胞/ウェルとなるように24-ウェル培養皿に播種した。3週間培養を継続した後、限界希釈法により、0.3細胞/ウェルとなるように96ウェル培養皿 (Nunc #167008) に細胞を播種し、一個の細胞のみが播種されているウェルから増殖してきた細胞を拡大培養した。その結果、線維芽細胞様の細胞と、敷石状の細胞が得られ、クローニングに成功した。

ヒト臍帯血由来CD34陽性細胞分画を、線維芽細胞様の細胞と二週間共培養し、

培養系中のコロニー形成細胞の有無について検討したところ、線維芽細胞様の細胞との共培養系中にはコロニー形成細胞が認められなかった。そこで、敷石状の形態を示す細胞7クローンについて同様の検討を行い、ヒト造血幹細胞の増殖支持活性を有するクローンが3つ得られた。これらをAGM-s1、AGM-s2及びAGM-s3と命名した。さらにこの3クローンを用いて造血細胞の支持能について検討した。

< 2 > AGM由来ストローマ細胞株の造血幹細胞に対する支持能の評価

上記のようにして樹立されたAGM由来ストローマ細胞株の造血幹細胞に対する支持能について、ヒトCD34陽性幹細胞を用いて検討した。

(1) ヒト臍帯血CD34陽性幹細胞の取得

ヒト臍帯血は東京大学医科学研究所のガイドラインに沿って、正常分娩時に採取した。Sui等の方法 (Sui, X., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92:2859-2863, 1995) にしたがって、以下に示すようにしてCD34陽性幹細胞の分画を行った。ヒト臍帯血に10分の1量のシリカ (IBL) を添加し、10分毎によく混和しながら37℃で30分間放置した。その後、シリカ添加臍帯血をFicoll/Hypaque (Pharmacia Biotech) 比重遠心に供し、単核細胞を分離した。次に、この単核細胞を、抗CD34抗体を被覆した磁性体ビーズ (Dynabeads M-450 CD34) と細胞を反応させて、CD34を発現している細胞をビーズに結合させた後、磁場を利用してCD34陽性細胞を分離した後、前記抗体とは別のCD34抗体 (DETACHaBEAD CD34; Dynal社, Oslo) を用いて、CD34陽性細胞分画を溶出した。この細胞集団をヒト臍帯血造血幹細胞集団として使用した。この細胞集団は、CD34抗体によるFACS (fluorescence activated cell sorting) 分析 (Ortho Diagnostics Systems社製セルソーターを使用) で、85から95%のCD34陽性細胞を含むことを確認した。

(2) ヒト造血幹細胞に対する支持能の評価

(i) ヒト造血幹細胞とAGM由来細胞との共培養

上記< 1 >で樹立された3種のAGM由来ストローマ細胞株 (AGM-s1、AGM-s2、AGM-s3)、あるいはマウス骨髄由来ストローマ細胞株であるMS-5 (Itoh, K., Exp. Hematol., 17:145-153, 1989) を、10% FCSを含むMEM培地を用いて24ウェルの培養皿の底一面を覆うまで増殖させた。MS-5は、新潟大学理学部生物学科森和博

教授より供与され、10% FCSを含むMEM培地にて維持したものをを用いた。

上記のようにして増殖させたストローマ細胞AGM-s1、AGM-s2、AGM-s3を各 5×10^3 /ウェル、あるいは、マウス骨髄由来ストローマ細胞株であるMS-5を 1×10^4 /ウェル、24ウェルの培養皿に播種し、10%FCSを含むMEM培地にて2日間培養し、細胞が培養皿の底一面を覆うまで増殖させた。このストローマ細胞上に、(1)で精製したCD34陽性ヒト臍帯血由来造血幹細胞1500個又は500個を重層し、1mlの10% FCSを含むMEM培地にて共培養した。共培養開始後、1週間後に同様の培地1mlをさらに添加した。2週間後より、培地の半量を新鮮な同培地と交換し、培養を継続した。共培養開始後の各時点において、トリプシン処理(0.05% トリプシン、0.53mM EDTAを含むPBS中、37℃、3～5分)し、ストローマ細胞とヒト血液細胞を同時に培養皿より剥がし、以下に示すように造血幹細胞及び造血前駆細胞の増殖状況を評価した。

(ii) コロニーアッセイによる造血幹細胞及び造血前駆細胞の増殖状況の評価

上記共培養系にて培養した細胞は、適宜希釈して1mlメチルセルロース培養系に付し、3連で解析を行った。メチルセルロース培養系は、 α -培地(Flow Laboratories社)に0.9%メチルセルロース(信越化学)、30%ウシ胎児血清(HyClone社)、1%結晶化脱イオンウシ血清アルブミン分画V(Sigma社)、0.05mM 2-メルカプトエタノール(Eastman社)、100ng/ml ヒトSCF(幹細胞成長因子(stem cell factor))、20ng/ml ヒトIL-3(インターロイキン-3)、2units/ml EP0(エリスロポエチン)、100ng/ml ヒトIL-6(インターロイキン-6)、10ng/ml ヒトG-CSF(顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor))を添加し、培養皿(Falcon社製、#1008)にて実施した。上記で用いた各種造血因子は、いずれもリコンビナント体であり、純粋なものである。

2週間の培養で出現してくるコロニーについて、顕微鏡下で観察し、出現してきた細胞の性質について解析した。具体的には、出現したCFU-G(granulocyte colony-forming unit)、CFU-M(macrophage colony-forming unit)、CFU-GM(granulocyte-macrophage colony-forming unit)、BFU-E(erythroid burst forming unit)、CFU-GEMM(granulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-macrophage colony-for

ming unit)の数を計測し、ストローマ細胞との共培養開始時のヒトCD34陽性細胞をメチルセルロース培養系に付したときに出現したコロニー数で割った値を増殖倍率とした。

(i)において、共培養に1500個のCD34陽性ヒト臍帯血由来造血幹細胞を用いたときに、共培養開始から4週間後にコロニーアッセイを行った結果を図1に示す。1500個のCD34陽性ヒト臍帯血由来造血幹細胞をAGM由来ストローマ細胞と共培養した後のコロニー形成数を計数した。培養開始時の1500個のCD34陽性細胞に含まれていた各コロニー形成細胞数を1として、共培養後の各コロニー形成数を表示した。すなわち、共培養による各コロニーの増殖倍率が示されている。

また、共培養に500個のCD34陽性ヒト臍帯血由来造血幹細胞を用いたときに、共培養開始から3週間後及び6週間後にコロニーアッセイを行った結果を、それぞれ図2、3に示す。コロニー形成数の表示は図1と同様であり、培養開始時の500個のCD34陽性細胞に含まれていた各コロニー形成細胞数を1として共培養後のコロニー形成数を表示した。

なお、図1から図3において、CFU-Gはgranulocyte colony-forming unit、CFU-Mはmacrophage colony-forming unit、CFU-GMはgranulocyte-macrophage colony-forming unit、BFU-Eはerythroid burst forming unit、CFU-GEMMはgranulocyte-erythrocyte-megakaryocyte-macrophage colony-forming unitの略称である。

これらの結果で特徴的なのは、好中球、赤血球、マクロファージ、巨核球への分化が可能なCFU-GEMMが、AGM-s1、AGM-s3細胞との共培養系において著明に増幅していることである。CFU-GEMMは造血系の非常に未分化な細胞であり、上記の結果は、マウスAGM由来のストローマ細胞株との共培養により、ヒト造血系の未分化な細胞を分化させずに増幅させていることを示している。これまでに骨髓から樹立したストローマ細胞株ではこのようにヒトCFU-GEMMを増幅させることはできない(Nishi, N., Exp. Hematol. 24: 1312-1321, 1996)。本実施例においても、図2、図3に示されるように、マウス骨髓から樹立されたストローマ細胞であるMS-5では共培養後CFU-GEMMはほとんど観察されなかった。したがって、このヒト造血幹細胞を支持する活性は、AGM由来のストローマ細胞株に特徴的であると考えられる。

さらに、AGM-s2細胞ではCFU-GEMMの増加は確認されなかった。つまり、AGM由来のストローマ細胞株で同じような形態をした細胞の中でも、ヒト造血支持能のある細胞は限られていると考えられる。前述の線維芽細胞様の細胞についてもヒト造血幹細胞を維持する活性が認められなかったように、AGM領域に存在する細胞の中でも特定の細胞種がヒト造血幹細胞の維持能をもっていることが明らかにされた。

また、ヒト造血幹細胞の増殖を支持するAGM-s1、AGM-s3を用いた共培養系では、CFU-GM、CFU-G、CFU-Mのヒト造血前駆細胞も増殖させることができた。

以上のことは、マウスAGM由来ストローマ細胞株が、ヒトの造血幹細胞、造血前駆細胞の増殖を支持できるということを示している。すなわち、造血幹細胞の増殖メカニズムは種を越えて保存されており、ヒトの造血幹細胞、造血前駆細胞の増殖は、ヒト以外の異種の生物由来のAGM由来ストローマ細胞をもってしても可能であることが示された。

実施例2 AGM由来ストローマ細胞株のマウス骨髄造血幹細胞に対する 増殖支持活性の検討

実施例1で得られたマウスAGM由来ストローマ細胞株について、マウス骨髄由来造血幹細胞に対する増殖支持活性を確認した。

<1>マウス骨髄からの造血幹細胞の調製

C57BL/6マウス（8週齢、雄）（日本SLC株式会社）の大腿骨内の骨髄細胞を取り出し、10% FCSを含むMEM培地にけん濁した。定法にしたがい（高津聖志、免疫研究の基礎技術、羊土社 1995）マウス骨髄単核細胞分画を比重遠心法により濃縮した後、染色バッファー（5% FCS、0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS）にけん濁し、以下の方法により造血幹細胞分画を取得した（Osawa, M., J. Immunol., 156:3207-3214, 1996）。フィコエリスリン結合Sca-1抗体（PharMingen社）、アロフィコシアニン結合抗c-KIT抗体（ライフテックオリエンタル社）、および、分化マーカー（Lin）として以下の6種類のビオチン化した分化抗原特異的な抗体、CD45R/B220（RA-36B2）、CD4（RM4-5）、CD8（53-6.72）、Gr-1（RB6-8C5）、TER119（以上の5つの抗

体は、Pharmingen社、SanDiegoより購入)、Mac-1(M1/70.15.1)(Serotec社、Oxford, UK)を細胞けん濁液に添加し、20分間、氷中で反応させた。染色バッファで2回洗浄した後、染色バッファにけん濁し、テキサスレッド結合ストレプトアビジン(Life Technologies社)を添加し、氷中に20分放置した。2回洗浄した後、セルソーティング(Becton Dickinson社、FACSVantage)に供して、分化抗原陰性、Sca-1抗体陽性、かつ、c-KIT陽性の造血幹細胞(c-KIT⁺Sca-1⁺Lin⁻造血幹細胞)を分取した。FACSの設定は、ネガティブコントロールとして、フィコエリスリン結合ラットイムノグロブリンG2a(Cedarlane)、アロフィコシアニン結合ラットイムノグロブリンG2b(Pharmingen)、あるいはテキサスレッド結合ストレプトアビジンのみで染色した骨髓細胞を用いて調整し、抗体に特異的に染色されている細胞のみを分取した。

< 2 > AGM由来ストローマ細胞株及びマウス骨髓由来造血幹細胞の共培養

AGM-s3を 5×10^3 ずつ24ウェルの培養皿に播種し、10% FCSを含むMEM培地にて2日間培養し、細胞が培養皿の底一面を覆うまで増殖させた。前述のマウス骨髓由来c-KIT⁺Sca-1⁺Lin⁻造血幹細胞100個を重層し、1 mlのFCS 10%を含むMEM培地にて培養した。培養開始1週間後に、同様の培地をさらに1 ml添加した。培養10日目に、トリプシン処理(0.05% トリプシン, 0.53mM EDTAを含むPBS中、37°C、3~5分)し、ストローマ細胞と造血細胞を同時に培養皿より剥がした。共培養開始時に採取したc-KIT⁺Sca-1⁺Lin⁻造血幹細胞の一部と、共培養を行った細胞について、以下に示す造血幹細胞の評価実験を行い、造血幹細胞の増殖状況を解析した。

上記共培養系にて培養した細胞は、適宜希釈して1 mlメチルセルロース培養系に付し、3連で解析を行った。メチルセルロース培養系は、 α -培地(Flow Laboratories社)に0.9%メチルセルロース(信越化学)、30%ウシ胎児血清(HyClone社)、1%結晶化脱イオンウシ血清アルブミン分画V(Sigma社)、0.05mM 2-メルカプトエタノール(Eastman社)、100ng/ml マウスSCF、20ng/ml マウスIL-3、2units/ml ヒトEPO、100ng/ml ヒトIL-6、10ng/ml ヒトG-CSF、4ng/ml ヒトTP0を添加し、培養皿(Falcon社製、#1008)にて実施した。10日間の培養で出現してくるコロニーについて、顕微鏡下で観察し、出現してきた細胞の性質について解析

した。

結果を図4に示す。増殖倍率は、共培養開始時のマウス骨髄由来c-KIT⁺Sca-1⁺Lin⁻造血幹細胞100個に含まれている各コロニー形成細胞の数を1とし、共培養後の各コロニー形成数を表示した。赤血球コロニーを含むCFU-GEMMが著明に増加しており、マウス造血幹細胞が、AGM由来ストローマ細胞株との共培養によって増殖することが確認された。

<3>マウスへの血液細胞移植

上記のマウス骨髄由来c-KIT⁺Sca-1⁺Lin⁻造血幹細胞100個、あるいは、適宜希釈した<2>の共培養系から回収した細胞を、各々3匹の920Radのγ線照射したC57BL/6マウス(8週齢、雄)に、尾静脈より移植した。移植後12日にマウスより脾臓を摘出し、脾臓に形成されたコロニー数(CFU-S12: day 12 spleen colony-forming unit)を算定した。

その結果、c-KIT⁺Sca-1⁺Lin⁻造血幹細胞100個を移植したマウスでは、3±1個の脾臓コロニーが形成された。一方、共培養系から回収した細胞1ウェル分を6分の1に希釈して移植したマウスでは、4±1個の脾臓コロニーが検出された。したがって、当初100個のc-KIT⁺Sca-1⁺Lin⁻造血幹細胞からは、約24(4×6)個の脾臓コロニー形成細胞に増殖していたと計算される。すなわち、共培養によって脾臓コロニー形成細胞は約8倍に増殖した。

この結果は、脾臓コロニーを形成できる造血幹細胞が、AGM由来ストローマ細胞株との共培養により増殖していることを示している。マウス造血幹細胞の増殖をAGM由来ストローマ細胞株が支持するということは、ヒトの造血幹細胞の増殖を、AGM由来ストローマ細胞株が支持できるという結果をサポートしている。

実施例3 免疫不全マウス移植系を用いたヒト造血幹細胞分画の維持、増殖の確認

<1>ヒト臍帯血細胞の免疫不全マウスへの移植

ヒト造血幹細胞あるいは前駆細胞のAGM-s3による維持、増殖を確認するため、ヒトの造血幹細胞を含むヒト臍帯血細胞をAGM-s3と共培養し、免疫不全マウスへ

移植した。免疫不全マウスに生着するヒト造血細胞の解析を行うことで、骨髓球系ならびにリンパ球系への分化が可能な多分化能を有するヒト造血幹細胞および造血前駆細胞の共培養後の生存・増殖について検討を行った。

詳細には、ヒト臍帯血由来の単核球細胞 1×10^6 個を、分離直後、およびAGM-s3と4週間共培養後に、NOD/Shi-scidマウスに移植した。細胞の調製および共培養の条件は実施例1と同様に行った。NOD/Shi-scidマウスへの細胞の移植は、300 Radの γ 線を照射した8から10週齢のNOD/Shi-scid（実験動物中央研究所）の尾静脈より細胞を移植することにより行った。さらに、NOD/Shi-scidのNK細胞活性を抑制するために抗アシアロGM-1抗体（ $20 \mu\text{g/ml}$ ）（和光純薬） $300 \mu\text{l}$ を、移植実施の直前と移植後11日目に腹腔内投与した。移植後5週目にマウスより骨髓細胞を採取し、ヒト細胞を特異的に認識する各種抗ヒト血球マーカー抗体で染色することによって、ヒトの血液細胞の生着を確認した。細胞を移植していないマウスから採取した骨髓細胞についても同様に染色を行った。これらの染色技法、および以下のFACSを用いた解析は、実施例1に記載の方法と同様にして行った。

<2>マウス骨髓におけるヒト造血細胞の検出

移植後のマウス骨髓細胞について汎血球マーカーであるCD45の発現を、FITC標識抗ヒトCD45抗体（Becton Dickinson社）を用いてFACSにより検出した。また、FACSのネガティブコントロールとしてFITC標識マウスIgG1（Becton Dickinson社）を用いた。その結果、細胞を移植していないマウスの骨髓細胞では、抗ヒトCD45抗体に反応する細胞は検出されなかった。一方、分離直後の単核球を移植したマウスでは6.2%の骨髓細胞がヒト細胞であった。また、AGM-s3と共培養を行った単核球を移植したマウス骨髓でも5.2%の細胞がヒトの細胞であった。この結果は、移植したヒト造血細胞に造血幹細胞あるいは造血前駆細胞が含まれていたため、免疫不全マウスに移植した後5週間にわたり、ヒトの造血細胞の出現が認められたと考えられる。さらに、AGM-s3と共培養せずに移植したものと、共培養後に移植したものとで、マウス骨髓におけるヒト細胞の存在比率がほとんど変わらなかったことは、AGM-s3上で造血幹細胞あるいは造血前駆細胞が生存あるいは増殖していたと結論できる。

＜3＞マウスに移植したヒト造血細胞の骨髄球系、リンパ球系細胞への分化能

上記移植マウス骨髄中の抗ヒトCD45抗体に陽性のヒト血液細胞の表面抗原を詳細に解析し、移植したヒト細胞が各種血球に分化していることを確認した。すなわち、Cy5標識フィコエリスリン（PECy5）標識CD45抗体と、各種分化抗原に対する抗体、つまり、フィコエリスリン（PE）標識の抗CD13抗体、抗CD33抗体、抗CD14抗体、抗CD19抗体、FITC標識の抗CD10抗体、又は抗CD34抗体とを用いて二重染色した。これらの抗体は、抗CD34抗体のみImmunoteck社より購入し、その他のすべての抗体はBecton Dickinson社より購入した。FACSを用いてCD45陽性細胞をゲートし、ヒト血液細胞でのこれら分化抗原の発現を解析した。

その結果、CD45陽性細胞の内、CD34陽性細胞が8%の頻度で存在していることが確認された。この結果は、幼若な造血細胞が、4週間のAGM-s3との共培養において維持され、かつマウスに移植後も幼若な形質を維持していたことを示している。

さらに、CD45陽性細胞の内、骨髄球の分化マーカーであるCD13、CD33、CD14の各抗原が陽性の細胞は、それぞれ29%、38%、12%であった。また、リンパ球系の細胞については、B細胞マーカーであるCD19陽性細胞は58%の頻度で存在が確認された。レシピエントマウスに骨髄球系およびリンパ球系の細胞の出現が同時に認められたことから、移植されたヒト造血細胞中には骨髄球細胞、リンパ球細胞に分化が可能である未分化な造血幹細胞あるいは造血前駆細胞が存在していたことが示された。すなわち、4週間のAGM-s3との共培養で、多分化能を有するヒト造血幹細胞を生存もしくは増殖させることが可能であると考えられる。

実施例4 移植実験を用いたマウス骨髄由来造血幹細胞に対する 生存または増殖促進活性の検討

以下に示す細胞分画法の基本的な手技は、Herzenberg, L. A., "Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5th edition", Blackwell Science Inc. 1997; 高津聖志、「免疫研究の基礎技術」羊土社、1995にしたがい行った。細胞分離用に用いた抗体は全て、Pharmingen社より購入した。

8～10週令のC57BL-Ly5.1^{pep}マウス（日本クレアに飼育委託）より骨髄細胞

を分離した。骨髓細胞懸濁液をLymphoprep (Nycomed社) に重層し、1500rpm, 25°C, 30分間遠心し、Lymphoprepと上層との界面に集まった細胞を回収した。細胞を染色バッファー (PBS (リン酸緩衝生理食塩水)、5% FCS (Hyclone社)、1mM EDTA、0.05% NaN₃) で2回洗い、染色バッファーに懸濁した。この細胞懸濁液に分化抗原マーカーに対するビオチン化抗体、つまり、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD11b抗体、抗Gr-1抗体、抗B220抗体、及び抗Ter119抗体を添加し、氷中で30分間放置した。その後、染色バッファーで2回洗浄後、アビジンをコートした磁性体ビーズ (アビジンマグネットビーズ、Perseptive社) を添加し、氷中で30分間放置した。再度、染色バッファーで2回洗浄後、磁石を用いてマグネットビーズを集めて、分化抗原を発現している細胞を除去し、分化抗原陰性細胞群 (Lin⁻細胞) を取得した。

Lin⁻細胞に、FITC標識抗CD34抗体、フィコエリスリン (PE) 標識抗Sca-1抗体、Texas Red標識アビジン、およびアロフィコシアニン (APC) 標識抗c-KIT抗体を添加し、氷中で30分間放置した。染色バッファーで2回洗浄後、セルソーター (FACS Vantage, Becton Dickinson社) にて、造血幹細胞画分 (CD34陰性～弱陽性、Sca-1陽性、c-KIT陽性細胞) を選別した。造血幹細胞とAGM-s3を共培養する際の基礎培地としては、 α MEM培地 (GIBCO社) に10% FCS (Hyclone社) を添加したものを用いた。5×10⁴個のAGM-s3を48穴プレートに播種後、3日間培養した。このAGM-s3上に、セルソーターにより分離した造血幹細胞を50個ずつ加え、0および1週間培養を行った。

培養後、PBS (GIBCO社) で1回洗浄し、トリプシン液 (GIBCO社) を添加した。37°C、5分間静置後、細胞培養用培地を添加し細胞を回収した。回収した細胞を96穴プレートに添加し、さらに放射線照射マウスの短期間の生存を支持するためレスキュー細胞として、C57BL/6N (日本チャールスリバー) の骨髓から調製したLin⁻細胞を各ウェルに10⁴個加えた。各ウェルの細胞を懸濁後、X線を致死線量照射 (9.5Gy) したC57BL/6N (日本チャールスリバー) に尾部静脈より移植した。移植後経時的に、各マウスの眼窩静脈より血液を採取し、赤血球を溶血後、細胞をFITC標識抗Ly5.1抗体、PE標識抗Mac-1抗体、PE標識抗Gr-1抗体、APC標識抗B220抗体、またはAPC標識抗Thy-1抗体で染色して、骨髓球系 (Mac-1陽性またはGr-1陽性)

細胞、及びリンパ球系（B220陽性またはThy-1陽性）細胞におけるLy5.1抗体陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにより算定した。

結果を、図5に示した。この図から明らかなように、AGM-s3上で造血幹細胞を培養したものでは、1、2ヶ月後の末梢血に占める培養幹細胞に由来する細胞の割合は、AGM-s3との共培養開始時の造血幹細胞を移植した群（Input）と同等であることが判明した。これらの結果から、本発明により、造血幹細胞あるいは造血前駆細胞を生存もしくは増殖させることが可能であると考えられる。

実施例5 マウス胎児造血幹細胞分画に対する生存又は増殖促進活性の検討

以下に示す細胞分画法の基本的な手技は、Herzenberg, L. A., "Weir's Handbook of Experimental Immunology, 5th edition", Blackwell Science Inc. 1997; 高津聖志、「免疫研究の基礎技術」羊土社、1995にしたがい行った。細胞分離用に用いた抗体は全て、Pharmingen社より購入した。

8週令以上の雌雄C57BL-Ly5.1^{pep}マウス（日本クレアに飼育委託）を交配し、交尾後14日目の雌マウスより胎児を摘出した。実体顕微鏡下で無菌的に胎児肝臓を分離し、23Gの針を通して肝臓細胞を分散させ、PBSに懸濁した。この肝臓細胞懸濁液を等量のLymphoprep（Nycomed社）に重層し、1500rpm, 20℃, 10分間遠心し、Lymphoprepと上層との界面に集まった細胞を回収した。細胞を染色バッファー（PBS（リン酸緩衝生理食塩水）、5% FCS（Hyclone社）、1mM EDTA, 0.05% Na₃N）で2回洗い、染色バッファーに懸濁した。細胞懸濁液に分化抗原マーカーに対するビオチン化抗体、つまり、抗CD3抗体、抗Gr-1抗体、抗B220抗体、及び抗Ter119抗体を添加し、氷中で30分間放置した。その後、染色バッファーで2回洗浄後、アビジンをコートした磁性体ビーズ（アビジンマグネットビーズ、Perseptive社）を添加し、氷中で30分間放置した。再度、染色バッファーで2回洗浄後、磁石を用いてマグネットビーズを集めて、分化抗原を発現している細胞を除去し分化抗原陰性細胞群（Lin⁻細胞）を取得した。

上記Lin⁻細胞に、フィコエリスリン（PE）標識抗Sca-1抗体、アロフィコシアニン（APC）標識抗c-KIT抗体、およびTexas Red標識アビジンを添加し、氷中で30分間放置した。染色バッファーで2回洗浄後、セルソーター（FACSVantage, Becton

Dickinson社)にて、造血幹細胞画分 (Sca-1陽性、c-KIT陽性、分化抗原陰性細胞) を選別した。上記造血幹細胞とAGM-s3を共培養する際の基礎培地としては、 α ME M培地 (GIBCO社) に10% FCS (Hyclone社) を添加したものをを用いた。5 \times 10⁴個のAGM-s3を48穴プレートに播種後、3日間培養した。このAGM-s3上に、セルソーターにより分離した造血幹細胞を10³個ずつ加え0および4日間共培養をおこなった。

培養後、PBSで1回洗浄し、トリプシン液 (GIBCO社) を添加した。37℃で5分間保温した後、細胞培養用培地を添加し細胞を回収した。回収した細胞を96穴プレートに添加し、さらに放射線照射マウスの短期間の生存を支持するためレスキュー細胞として、C57BL/6N (日本チャールスリバー) の骨髓から調製したSca-1陽性、c-KIT陽性、分化抗原陰性細胞を各ウェルに10³個加えた。各ウェルの細胞を懸濁後、致死量のX線 (9.5Gy) を照射したC57BL/6N (日本チャールスリバー) に尾部静脈より移植した。移植後経時的に、各マウスの眼窩静脈より血液を採取し、赤血球を溶血後、細胞をFITC標識抗Ly5.1抗体、PE標識抗Mac-1抗体、PE標識抗Gr-1抗体、APC標識抗B220抗体、またはAPC標識抗Thy-1抗体で染色して、骨髓球系 (Mac-1陽性またはGr-1陽性) 細胞、及びリンパ球系 (B220陽性またはThy-1陽性) 細胞におけるLy5.1抗原陽性細胞の割合、すなわち移植細胞由来の血液細胞の割合をフローサイトメトリーにより算定した。

結果を図6に示した。この図から明らかなように、AGM-s3上で造血幹細胞を培養したものでは、移植から1、2ヶ月後のレシピエントマウスの末梢血に占める培養造血幹細胞に由来する細胞の割合は、AGM-s3との共培養開始時の造血幹細胞を移植した群 (Input) と同等もしくはそれを上回っていることが判明した。これらの結果を考慮すると、本発明により、胎児由来の造血幹細胞あるいは造血前駆細胞を生存もしくは増殖させることが可能であると考えられる。

産業上の利用の可能性

本発明のストローマ細胞株は、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持することができる。

本発明のストローマ細胞株を用いると、造血幹細胞および造血前駆細胞を増殖させることができる。

- 31 -

本発明の方法により増殖した造血幹細胞および造血前駆細胞は、血液細胞移植用の移植片、遺伝子治療用の標的細胞として好適に利用することができる。

請求の範囲

1. 哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株。
2. 造血幹細胞または造血前駆細胞を少なくとも一部が多分化能を維持したまま増殖させ得る請求項1記載の細胞株。
3. 少なくとも一部が細胞周期の回転を伴うように造血幹細胞または造血前駆細胞を生存させ得る請求項1または2記載の細胞株。
4. 前記造血幹細胞および造血前駆細胞がヒト由来である請求項1～3のいずれか一項に記載の細胞株。
5. 発癌遺伝子またはアポトーシス関連遺伝子が導入され、該遺伝子によって自己の増殖または生存が調節される請求項1～4のいずれか一項に記載の細胞株。
6. 細胞刺激因子をコードする遺伝子が導入された請求項1～5のいずれか一項に記載の細胞株。
7. 前記哺乳動物がマウスである請求項1記載の細胞株。
8. 請求項1～7のいずれか一項に記載の細胞株とともに培養されて増殖した又は生存が維持された造血幹細胞または造血前駆細胞を含む移植片。
9. 請求項1～7のいずれか一項に記載の細胞株とともに培養されて増殖し又は生存が維持され、かつ、外来遺伝子が導入された造血幹細胞または造血前駆細胞を含む遺伝子治療用組成物。
10. 哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株とともに、少なくとも造血幹細胞もしくは造血前駆細胞を含む細胞群またはその分画物を培養することを特徴とする、造血幹細胞または造血前駆細胞の増殖または生存を支持する方法。

11. 前記細胞株に発癌遺伝子またはアポトーシス関連遺伝子が導入されていることを特徴とする請求項10記載の方法。
12. 前記細胞株に細胞刺激因子をコードする遺伝子が導入されていることを特徴とする請求項10記載の方法。
13. 前記培養に、細胞刺激因子の添加を伴う、請求項10または11記載の方法。
14. 前記細胞群が、臍帯血、胎児肝臓、骨髓、胎児骨髓、または末梢血由来である請求項10～13のいずれか一項に記載の方法。
15. 哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株とともに培養されて増殖した又は生存が維持された造血幹細胞または造血前駆細胞を移植することを特徴とする造血幹細胞または造血前駆細胞の移植方法。
16. 哺乳動物胎児のAGM領域から分離、株化され、かつ、造血幹細胞および造血前駆細胞の増殖または生存を支持し得る細胞株とともに培養されて増殖した又は生存が維持された造血幹細胞または造血前駆細胞に外来遺伝子を導入し、該遺伝子導入細胞を移植することを特徴とする遺伝子治療法。

1 / 5

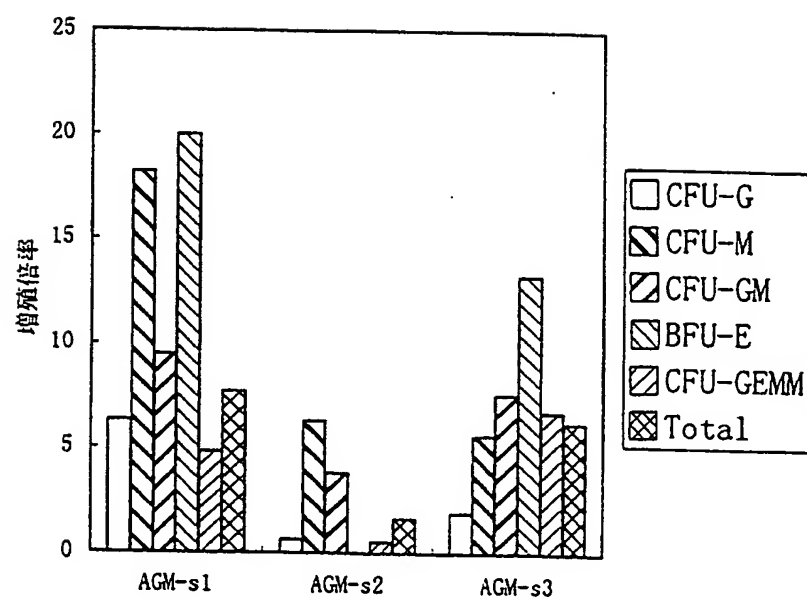


FIG. 1

2 / 5

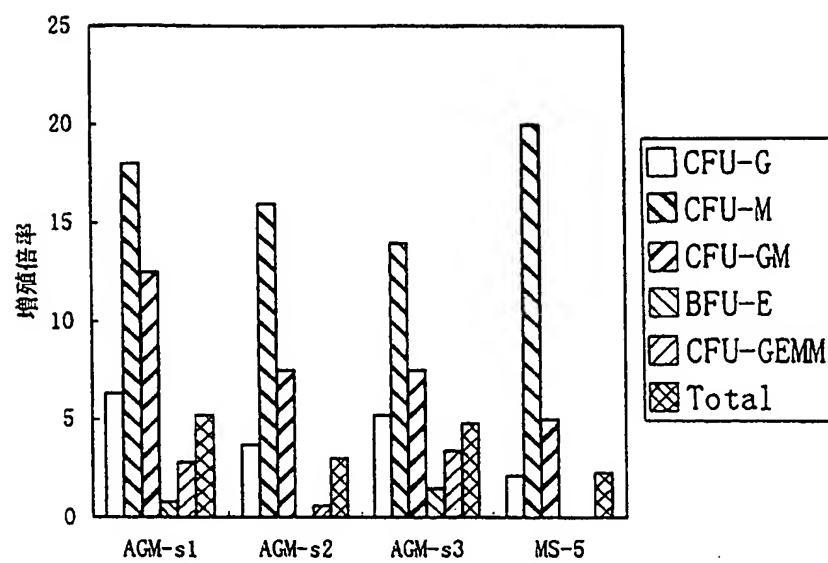


FIG. 2

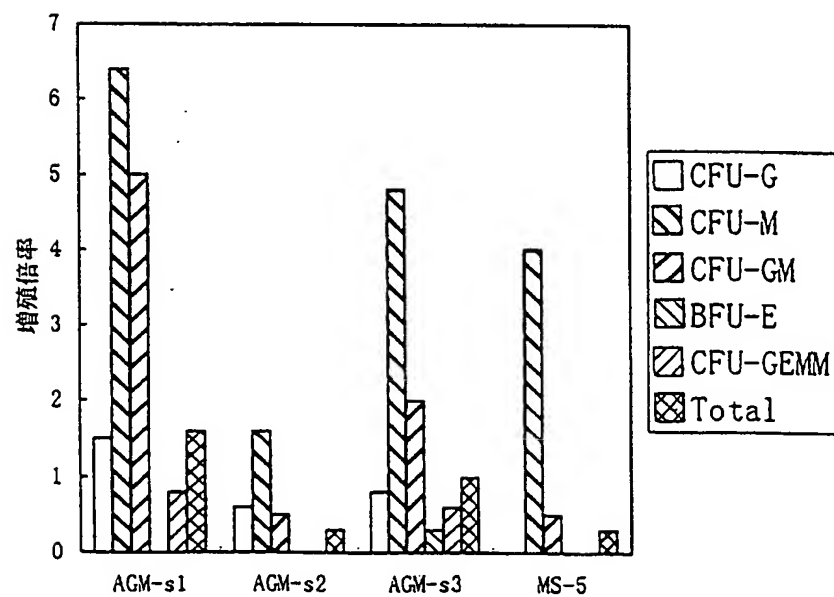


FIG. 3

3 / 5

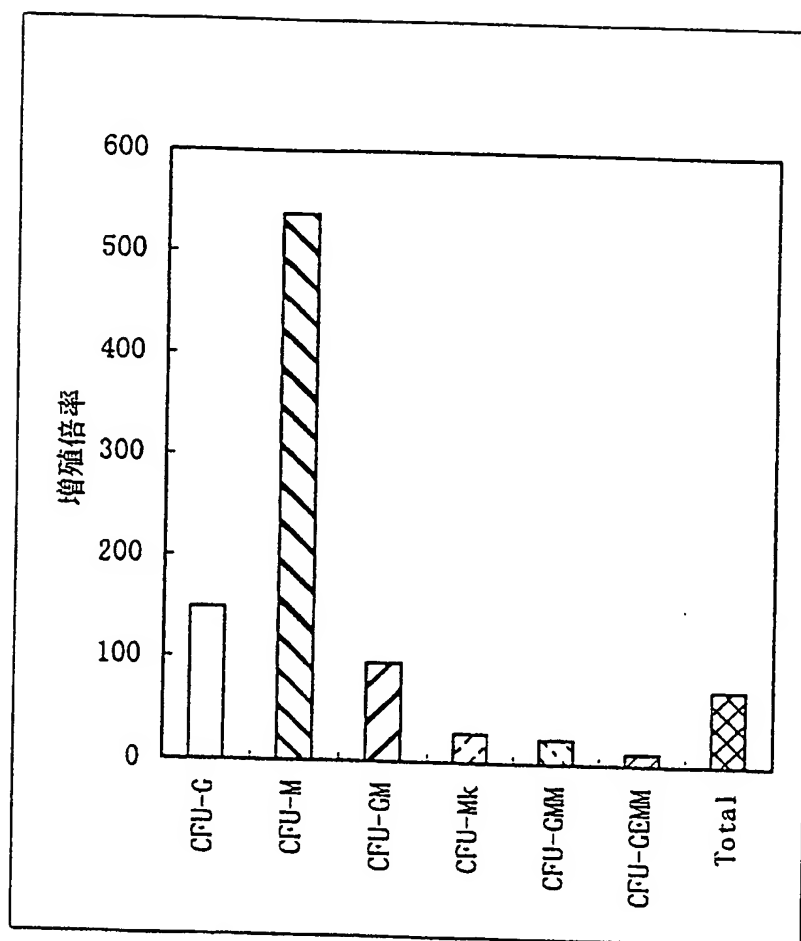
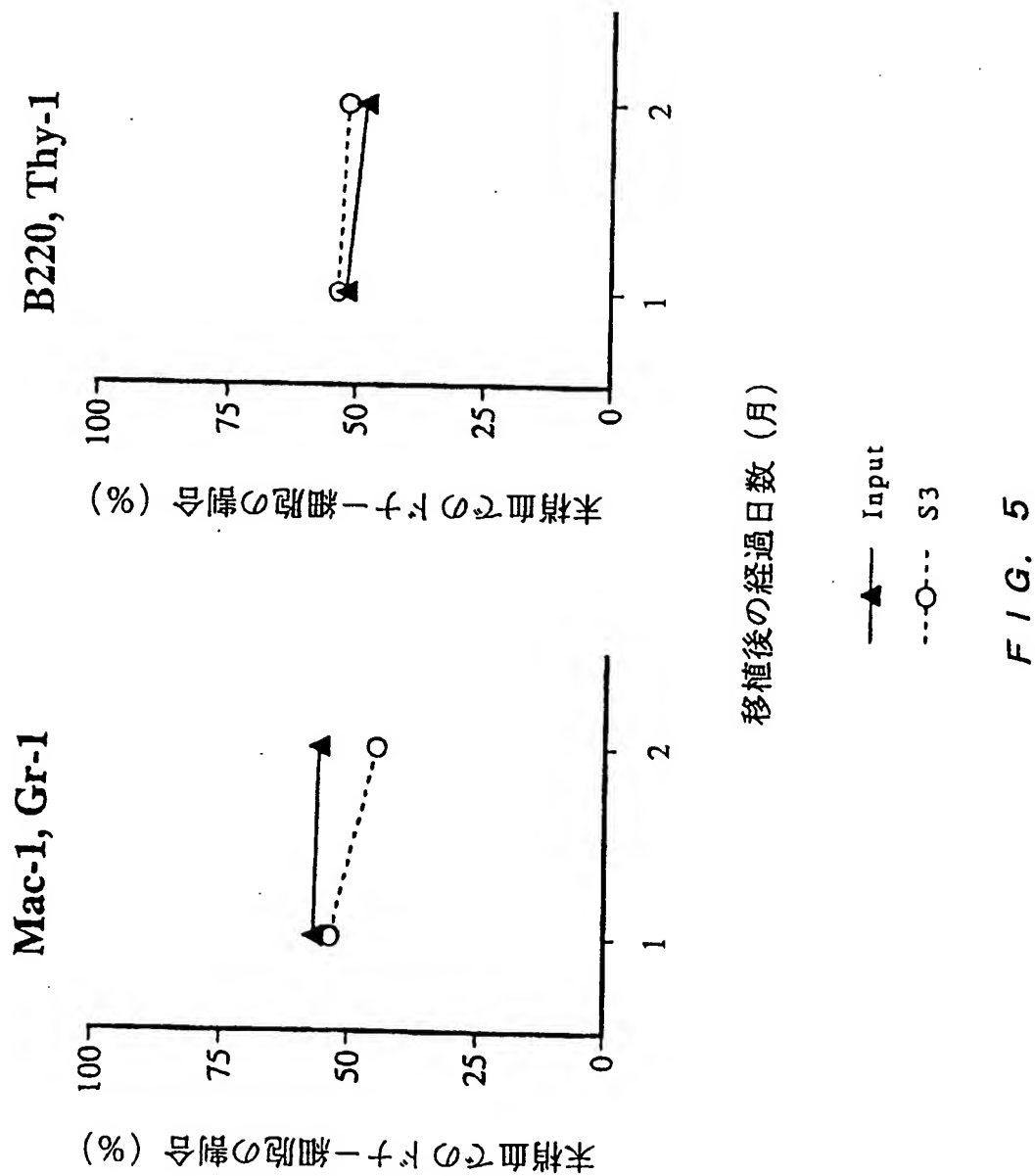
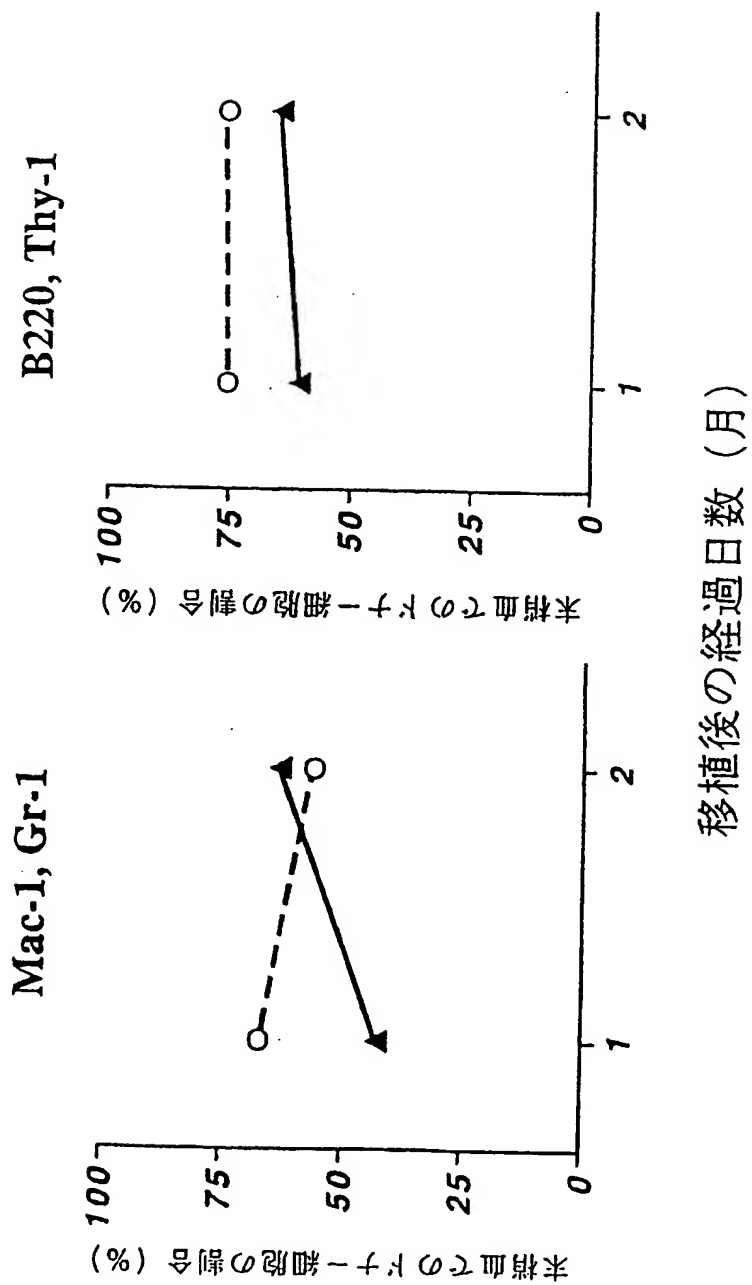


FIG. 4

4 / 5



5 / 5



—▲— Input
-○-- S3

F / G. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.C1⁶ C12N5/16, C12N5/06, C12N15/12, A61K48/00, A61K35/48, A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁶ C12N5/16, C12N5/06, C12N15/12, A61K48/00, A61K35/48, A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALIG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| PX | M. Xu et al., "Stimulation of human primitive hematopoiesis by murine AGM-derived stromal cells", Blood (15. 11. 1997), Vol. 90, No. 10, suppl. Part 1, p.483a | 1-14 |
| A | M. Tavian et al., "Aorta-Associated CD34 ⁺ Hematopoietic Cells in the Early Human Embryo", Blood (1996), Vol. 87, No. 1, p.67-72 | 1-14 |
| A | A. Medvinsky et al., "Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region", Cell (1996), Vol. 86, p.897-906 | 1-14 |
| A | B.A. Roecklein et al., "Functionally Distinct Human Marrow Stromal Cell Lines Immortalized by Transduction With the Human Papilloma Virus E6/E7 Genes", Blood (1995), Vol. 85, No. 4, p.997-1005 | 5, 6 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search
 1 October, 1998 (01. 10. 98)

 Date of mailing of the international search report
 13 October, 1998 (13. 10. 98)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP98/03209

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A | R.H. Whitehead et al., "Establishment of conditionally immortalized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993), Vol. 90, p.587-591 | 5, 6 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03209

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15, 16

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 15 and 16 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/03209

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 5/16, C12N 5/06, C12N 15/12, A61K 48/00, A61K 35/48, A61L 27/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N 5/16, C12N 5/06, C12N 15/12, A61K 48/00, A61K 35/48, A61L 27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALIG)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| PX | M. Xu et al. "Stimulation of human primitive hematopoiesis by murine AGM-derived stromal cells", Blood(15. 11. 1997), Vol. 90, No. 10, suppl. part 1, p. 483a | 1-14 |
| A | M. Tavian et al. "Aorta-Associated CD34 ⁺ Hematopoietic Cells in the Early Human Embryo", Blood(1996), Vol. 87, No. 1, p. 67-72 | 1-14 |
| A | A. Medvinsky et al. "Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region", Cell(1996), Vol. 86, p. 897-906 | 1-14 |
| A | B. A. Roecklein et al. "Functionally Distinct Human Marrow Stromal Cell Lines Immortalized by Transduction With the | 5, 6 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 10. 98

国際調査報告の発送日

13. 10. 98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

冨永 みどり

印

4 B

9 1 5 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

| C (続き) 関連すると認められる文献 | | |
|---------------------|--|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | Human Papilloma Virus E6/E7 Genes", Blood(1995), Vol. 85, No. 4, p. 997-1005 R. H. Whitehead et al. "Establishment of conditionally immortal ized epithelial cell lines from both colon and small intestine of adult H-2Kb-tsA58", Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1993), Vol. 90, p. 587-591 | 5, 6 |

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 15, 16 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求項15, 16は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、PCT17条(2)(a)及びPCT規則39(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。